

poly-L-arginine を用いた眼内薬物送達法に関する研究

甲第33号

根本 英一

poly-L-arginine を用いた眼内薬物送達法に関する研究

根本 英一

目次

総論の部

緒言	・・・	1
----	-----	---

第1章 摘出家兎眼表面組織における poly-L-arginine の透過促進効果

第1節 種々分子サイズおよび濃度の poly-L-arginine による親水性化合物 FITC-labeled dextran の家兎結膜透過性に対する効果	・・・	4
第2節 親水性化合物の角膜、結膜、結膜／強膜透過性に対する poly-L-arginine の効果	・・・	6
第3節 poly-L-arginine の結膜 integrity に対する影響	・・・	10
第4節 poly-L-arginine の結膜および角膜 viability に対する影響	・・・	11
第5節 小括および考察	・・・	12

第2章 poly-L-arginine の透過促進効果と tight junction の開口との関連性

第1節 家兎結膜における tight junction 関連タンパク質の発現	・・・	15
第2節 tight junction 関連タンパク質の organization に対する poly-L-arginine の効果	・・・	18
第3節 小括および考察	・・・	19

第 3 章	poly-L-arginine の家兎眼内への薬物吸収促進効果と安全性評価	22
第 1 節	poly-L-arginine による薬物の眼内吸収促進効果	22
第 2 節	in vivo 家兎における poly-L-arginine の安全性の評価	24
第 3 節	小括および考察	25
結論		28
謝辞		29
実験の部		
第 1 章	実験の部	30
第 2 章	実験の部	33
第 3 章	実験の部	35
参考文献		38

総論の部

緒言

ヒトは外部からの情報を目、耳、鼻、舌、皮膚などから得ているが、目は情報のおよそ 80% を収集する感覚器であるといわれており、生活の質 (quality of life; QOL) を維持する上で欠かせない重要な臓器の一つである。我が国では糖尿病患者の増加に伴う糖尿病性網膜症および高齢化社会の急進に伴う加齢性黄斑変性症の患者数の増加が予測されている。これらはいずれも失明に至る重篤な視力障害を引き起こす代表的な眼疾患であり、患者の QOL を大きく損なうことが知られている^{1, 2)}。これら疾患の発生および進行には、血管内皮成長因子 (VEGF) による網膜および脈絡膜での血管新生が関与するといわれている^{1, 2)}。これまで、これらの疾患の治療には、硝子体内手術や光凝固術などの外科的治療が行われ、薬物による治療は行われていなかった。最近、VEGF の働きを阻害する aptamer や抗体断片の有効性が明らかとなり^{3, 4)}、2005 年米国にて加齢性黄斑変性症に対する使用が認可された。また現在、糖尿病性網膜症に対しての臨床試験が行われており⁵⁾、今後これらの疾患に対する薬物療法の利用が高まっていくものと考えられる。しかし、これらの物質は角膜や結膜といった目の表面に存在する組織の透過性が非常に低いために (Fig. 1)、点眼では適用されず、治療は直接眼内への注射 (硝子体内注射) により行われる。しかし、硝子体内注射は、眼内出血、網膜剥離、水晶体損傷、眼内炎等の重篤な有害事象の発生率が高いことが報告されており^{3, 6)}、投与方法自体で重篤な眼障害を引き起こす可能性がある。本来薬物治療は、患者にとって有益なものでなければならず、このような投与方法による不利益は避けなければならない。したがって、硝子体内注射は患者にとって望ましい投与方法ではないと考えられ、安全かつ合理的な眼内への薬物送達法の構築が必要である。

点眼剤は、眼科領域の大部分を占め、これまで投与方法自体による有害事象は報告されていない。そこで著者は、患者にとって簡便に使用

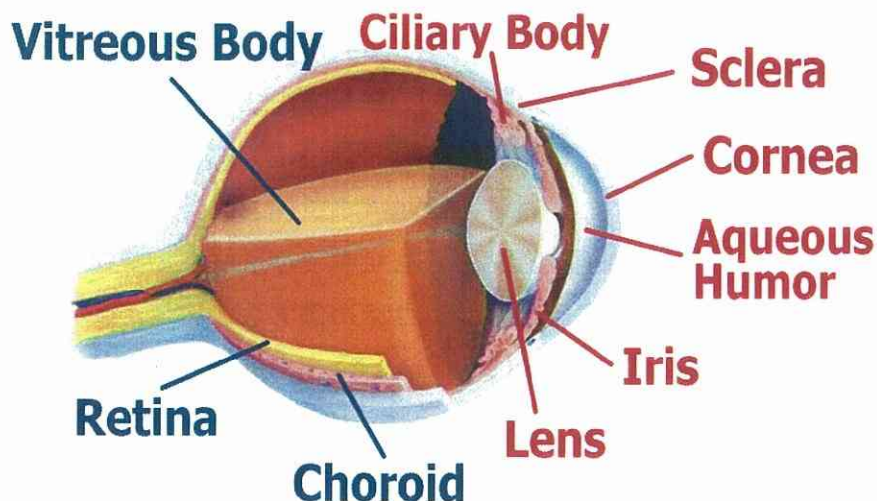


Fig. 1 Anatomical structure of the eye

でき、汎用性が高く眼内注射のように苦痛を伴わない点眼による薬物送達に着目した。しかし点眼においては、角膜や結膜といった眼表面の組織が薬物の透過に対するバリアとなるため、薬物の眼内への吸収量が少ないという欠点がある。この低い透過性を改善するために、これまでに透過促進剤に関するいくつかの研究が行われおり、胆汁酸塩や EDTA といった薬物可溶化剤やキレート化剤が、角膜および結膜の薬物透過性を増加させることが報告されている⁷⁾。しかし、これら化合物は、上皮の形態変化や上皮細胞からの細胞質内酵素の漏出、また赤血球の溶血を起こすことが報告されており⁸⁻¹⁰⁾、安全性の点からその臨床的な使用は困難であると考えられている。

最近、新規の透過促進剤候補物質としてキトサンおよび poly-L-arginine (PLA) のようなカチオン性ポリマーが注目されている。Illum らは、ラットにおけるインスリンの鼻粘膜を介した吸収がキトサンにより顕著に増大することを示している¹¹⁾。また PLA は、in vivo および in vitro 試験において fluorescein isocyanate-labeled dextran (FD) といった化合物やサケカルシトニンおよび α -心房性利尿ポリペプチドなどの鼻粘膜を介した吸収を促進することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。単層

上皮である鼻粘膜、Caco-2 および MDCK 細胞において、ポリカチオン類による透過促進効果と経上皮電気抵抗値との間に平行な関係が見出されており、さらに、細胞－細胞間で物質の透過を制限する機能を担う tight junction (TJ) を構成するタンパク質の分布が変化することから、ポリカチオン類の透過促進効果は、TJ の開口に起因するものであると考えられている¹⁵⁻²⁰⁾。一方、in vitro 試験において、PLA の鼻粘膜への適用は、細胞障害の指標となる鼻粘膜からの LDH の漏出や溶血を引き起こさないこと、さらには、in vivo 試験において、PLA が鼻粘膜の形態学的な変化を起さないことが報告されていることから^{13, 21)}、PLA は上皮粘膜を傷害することなく薬物の透過性を増大することができ、眼表面粘膜を含めた種々上皮粘膜からの薬物吸収を促進することが可能であると考えられる。

そこで、本研究では、PLA の眼内薬物送達における有用性と安全性を確認するために、第1章で、薬物の眼内への透過のバリアとなる角膜および結膜を用いて、PLA による透過促進効果を in vitro 試験にて評価した。第2章では、PLA による薬物の透過促進効果と TJ の開口との間の関連性について検討した。第3章では、in vivo での PLA の透過促進効果と安全性の評価を家兎を用いて評価した。以下得られた結果を3章に分けて論述する。

第1章 摘出家兎眼表面組織における poly-L-arginine の透過促進効果

結膜嚢に局所適用した薬物は、Fig 2 に示すように、角膜経路および結膜と強膜からなる非角膜経路を介して眼の内側領域に浸透する²²⁾。一般的に、角膜経路は内側領域への浸透の主要な経路であると考えられているが、角膜を透過しにくい親水性化合物の眼内への浸透および薬物の後眼部領域への浸透は、非角膜経路が主要な経路となることが示唆されて

いる^{23, 24)}。したがって、薬物の眼内への浸透には、角膜経路だけでなく、非角膜経路も重要な役割を担っている。いずれの経路においてもプライマリーバリアは角膜上皮および結膜上皮であると考えられている。本章では、家兎から摘出した角膜、結膜および結膜／強膜を用い、分子量約 3.8 kDa の FD (FD-4) や pyridoxamine といった親水性化合物の透過に対する PLA の促進効果について研究した。さらに、経時的な TEER のモニタリングにより結膜 integrity に対する PLA の影響を評価し、さらに、MTT 試験を用いて viability に対する影響を評価した。

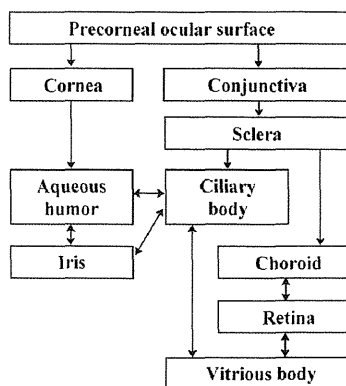


Fig. 2 Compartmentalized scheme of drug penetration across cornea and conjunctiva/sclera into anterior and posterior tissues.

第1節 種々分子サイズおよび濃度の poly-L-arginine による親水性化合物 FITC-labeled dextran の家兎結膜透過性に対する効果

鼻粘膜における PLA の透過促進効果は、その分子量および濃度に依存することが報告されている¹⁶⁾。そこでまず、分子量 14.0 (PLA (10))、

35.5 (PLA (50)) および 141.4 kDa (PLA (100)) の PLA を用いて、すでに実験法が確立している摘出角膜を用いた FD-4 透過試験から PLA の効果を評価した。また、適用濃度は 0.01、0.1 および 1 mg/ml とした。この試験では、PLA は透過試験の開始から 120 分後に適用し、PLA 適用前のみかけの透過係数 (P_{app}) をコントロールとした。PLA の適用により FD-4 の透過係数は、コントロールに比べ増大した (Fig. 3)。コントロールと 0.01、0.1、1 mg/ml PLA の適用から得られた透過促進率 ($PLA\ P_{app}/control\ P_{app}$ 比) は、それぞれ、PLA (10) で 1.1、3.2、13 倍、PLA (50) で 1.3、9.7、21 倍、PLA (100) で 2.4、9.8、24 倍であった。

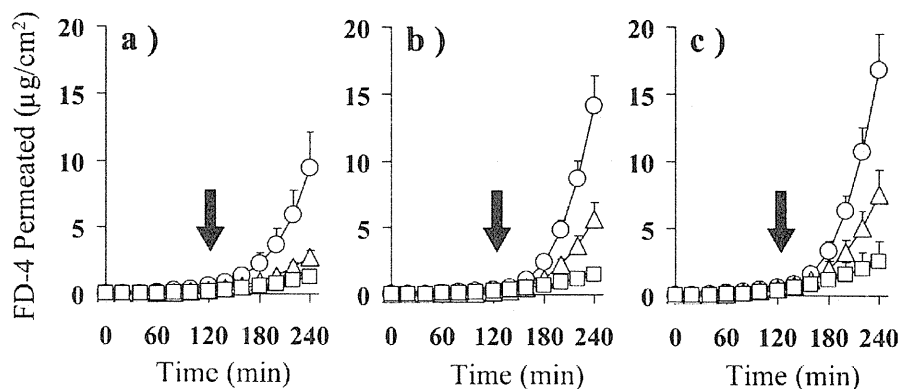


Fig. 3 Cumulative amount of FD-4 permeation through the rabbit conjunctiva in the presence of different concentrations and molecular weights of PLA. a) PLA (10), b) PLA (50), c) PLA (100). ○, 1 mg/ml PLA; △, 0.1 mg/ml PLA; □, 0.01 mg/ml PLA. Arrow, apical application of PLA. Each data point represents the mean \pm S.E. ($n = 4$).

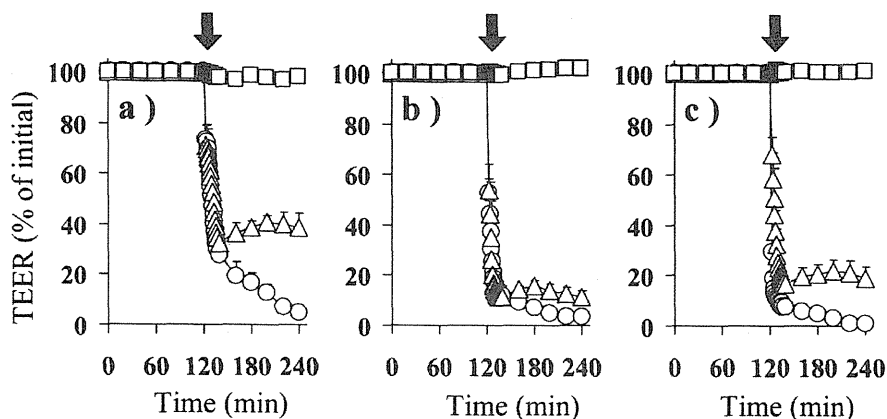


Fig. 4 Time-courses of the conjunctival TEER during the permeation study in the presence of different concentrations and molecular weights of PLA. a) PLA (10), b) PLA (50), c) PLA (100). O, 1 mg/ml PLA; Δ , 0.1 mg/ml PLA; \square , 0.01 mg/ml PLA. Arrow, apical application of PLA. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 4).

一方、0.01、0.1 および 1 mg/ml の PLA (10) の適用後における結膜の TEER は、それぞれ、ベースラインの 98、38 および 5% (Fig 4a)、PLA (50) では、102、12 および 3% (Fig 4b)、PLA (100) では、100、19 および 1% となり (Fig. 4c)、家兔摘出結膜における PLA の促進効果および TEER に対する効果は、濃度および分子サイズ依存的であると考えられた。以上の結果から、鼻粘膜と同様に¹⁶⁾、家兔摘出角膜においても PLA の効果は分子量および濃度依存的であることが明らかとなり、十分な促進効果および TEER の低下を示す 0.1 mg/ml PLA (50) を以下の研究で用いることとした。

第2節 親水性化合物の角膜、結膜、結膜／強膜透過性に対する poly-L-arginine の効果

次に、これまで PLA のようなポリカチオン類による透過促進効果は

経上皮電気抵抗値の低下と関連するといわれていることから¹⁵⁻¹⁸⁾、結膜で得られた FD-4 の Papp 値を対応する TEER の逆数 ($1/\text{TEER}$) に対してプロットした (Fig. 5)。0.1 mg/ml PLA (50)における FD-4 の Papp と $1/\text{TEER}$ の間には良い相関が認められ ($r^2 = 0.884$)、このことから TEER の低下、すなわち膜の極性領域の増大が PLA の促進効果に参与していることが明らかとなった。

Fig. 6a および b は、0.1 mg/ml PLA (50)の添加および非添加時の家兎角膜および結膜／強膜における FD-4 の累積透過量とそれに対応する TEER を示す。PLA (50)は、角膜 (Fig. 6a) および結膜／強膜 composite (Fig. 6b) において FD-4 の透過を増大させ、それに対応して TEER を減少させた。したがって、これらの膜においても結膜と同様に PLA は極性領域を拡大し透過促進効果を現すものと考えられた。

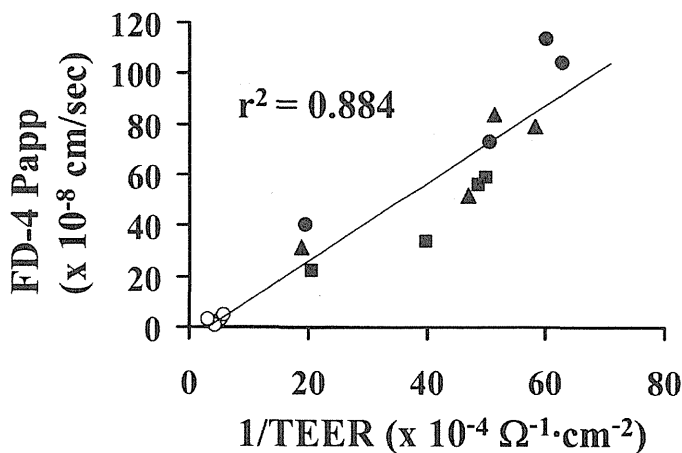


Fig. 5 Relationship between FD-4 Papp and $1/\text{TEER}$. FD-4 Papp and $1/\text{TEER}$ in the rabbit conjunctiva at 0 min (○), 80 min (■), 100 min (▲) and 120 min (●) after addition of 0.1 mg/ml PLA (50).

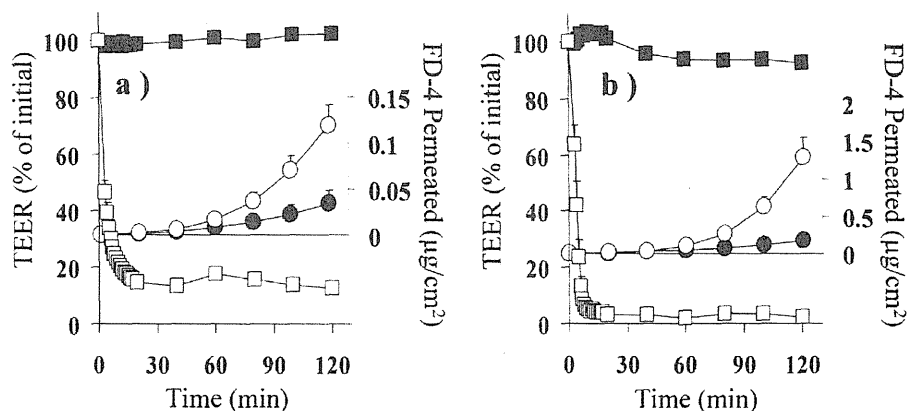


Fig. 6 Cumulative amount of FD-4 permeation through the rabbit a) cornea and b) conjunctiva/sclera composite and time-courses of TEER in the absence or presence of 0.1 mg/ml PLA (50). ○ and □, in the presence of 0.1 mg/ml PLA (50); ● and ■, in the absence of 0.1 mg/ml PLA (50). Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 4).

Tables 1 および 2 は、0.1 mg/ml PLA (50)の添加および非添加時の摘出角膜、結膜および結膜／強膜における親水性モデル化合物として用いた FD-4 および pyridoxamine の Papp を示す。FD-4 の結膜、角膜および結膜／強膜における Papp は、それぞれ、 7.39 ± 1.23 、 0.25 ± 0.05 および 2.48 ± 0.56 ($\times 10^{-8}$ cm/sec)であり、PLA (50)の添加により、9.78、6.81 および 7.91 倍増大した (Table 1)。同様に、pyridoxamine では、それぞれのベースライン (64.3 ± 2.56 、 1.54 ± 0.77 、 29.5 ± 3.24 ($\times 10^{-8}$ cm/sec)) から 4.67、7.98 および 8.31 倍増加させた。これらのことから、PLA の in vivo での結膜嚢への局所適用は、角膜および結膜／強膜経路を介した眼表面組織の薬物透過を促進し、点眼した薬物の眼内吸収を増大させることができると考えられる。

Table 1. Papp values of FD-4 across the cornea, conjunctiva, and conjunctiva-sclera composite in the presence and absence (control) of 0.1 mg/ml PLA (50).

	Cornea	Conjunctiva	Conjunctiva/Sclera
Control ($\times 10^{-8}$ cm/sec)	0.25 ± 0.05	7.39 ± 1.23	2.48 ± 0.56
PLA ($\times 10^{-8}$ cm/sec)	1.69 ± 0.35 [6.81]	72.2 ± 14.4 [9.78]	19.6 ± 3.12 [7.91]

[]: enhancement ratio, Data represent the mean \pm S.E. (n=4)

Table 2. Papp values of pyridoxamine across the cornea, conjunctiva, and conjunctiva-sclera composite in the presence and absence (control) of 0.1 mg/ml PLA (50).

	Cornea	Conjunctiva	Conjunctiva/Sclera
Control ($\times 10^{-8}$ cm/sec)	1.54 ± 0.77	64.3 ± 2.56	29.5 ± 3.24
PLA ($\times 10^{-8}$ cm/sec)	12.3 ± 1.22 [7.98]	300 ± 51.8 [4.67]	245 ± 24.9 [8.31]

[]: enhancement ratio, Data represent the mean \pm S.E. (n=4)

第3節 poly-L-arginine の結膜 integrity に対する影響

前節においてPLAによる薬物透過の促進はTEERの低下と関連することを明らかにした (Fig. 5)。TEERは組織の integrity の指標の一つであることが知られており、組織 integrity に PLA が影響を及ぼしていると考えられた。涙液のターンオーバーが2~3分であることや、点眼後の薬物が15~30秒で急速に排出(80%またはそれ以上)されるため²⁵⁾、点眼すると前節の in vitro 試験のように PLA が持続的に眼表面組織に暴露されることはない。したがって本節では点眼することを考慮し、PLA の一定時間暴露後に新鮮な bicarbonated Ringer's solution (BRS) で wash out したときの TEER の挙動から、結膜の integrity に対する PLA の影響について in vitro にて評価した。Fig. 7 は、0.1 mg/ml PLA (50) を10、30、60 および120分間適用し、PLA の適用から240分までの結膜の TEER の time-course を示している。PLA (50) の添加により、結膜の TEER はベースラインの17%まで減少したが、PLA を10、30、60 および120分後に wash out することにより、それぞれ、86、88、84 および68%まで回復した。鼻粘膜を用いた in vitro 実験から、低濃度の PLA の適用による減少した TEER は、徐々に回復することが報告されているが¹⁶⁾、PLA を wash out した実験は行われておらず、このような integrity の可逆性が本研究から初めて明らかとなった。以上のことから、PLA は結膜の integrity を減少させるが、この効果は一過的であることが明らかとなり、同様の現象が点眼時にも認められることが示唆される。

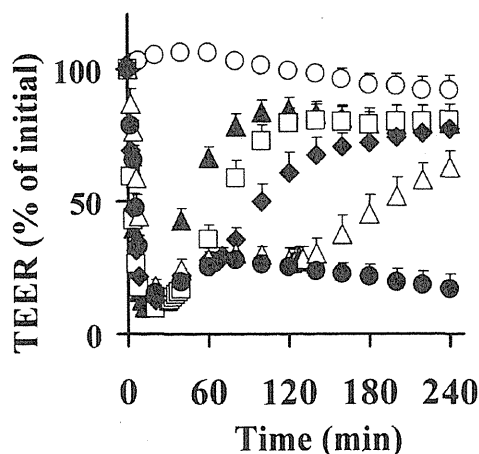


Fig. 7 Time-course of TEER in the rabbit conjunctiva following the apical application of 0.1 mg/ml PLA (50). ○, control; replacement of of apical side at (▲) 10min, (□) 30min, (◆) 60min, (△) 120 min after application of PLA; ●, no replacement. Each data point represents the mean \pm S.E. (n = 4).

第4節 poly-L-arginine の結膜および角膜 viability に対する影響

透過促進剤の組織 viability に対する影響は、実用性を考慮したときに大きな意味を持つ。そこで、結膜および角膜の viability に対する PLA (50) の影響を MTT 試験により評価した。PLA および STDHF (ポジティブコントロール) 適用後の formazan 生成量を Fig. 8 に示す。0.1 mg/ml STDHF の適用は、結膜の formazan 生成量を有意に減少させ、5 mg/ml では formazan 生成がほとんど認められなかった (Fig. 8a)。また、角膜においても 5 mg/ml の適用で formazan 生成を有意に減少した (Fig. 8b)。一方、0.1 および 5mg/ml PLA (50) 適用 120 分後の結膜および角膜の formazan 生成量は、コントロールと有意な差は認められなかった。これらの結果から、PLA は癌表面組織の viability に影響を与えないことが明らかとなった。

PLA は、in vitro 試験において鼻粘膜上皮から細胞内成分の漏出を

引き起こさないことや、in vivo 試験で鼻粘膜上皮の形態学的な変化を示さないことが報告されている^{13, 21)}。以上、PLA は細胞毒性をほとんど示さないと考えられる。

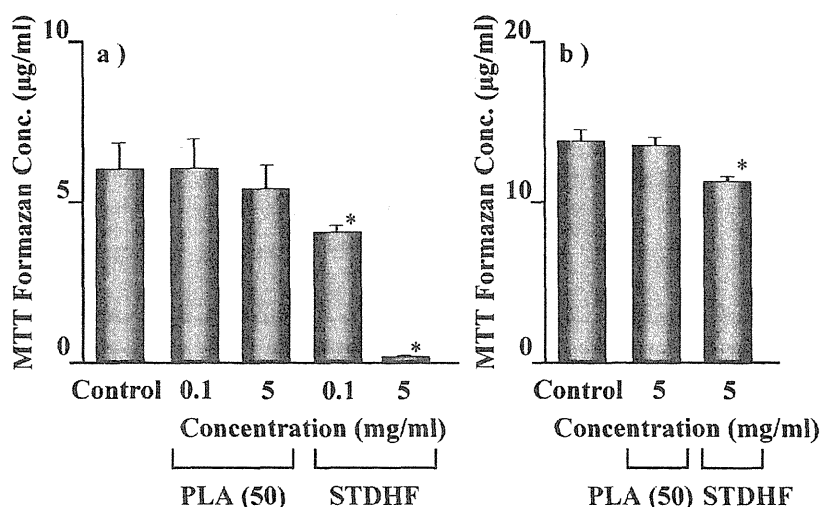


Fig. 8 Formazan production after application of different compounds in a) conjunctiva and b) cornea. * $p < 0.05$ vs. control. Each data point represents the mean \pm S.E. ($n = 4$).

第5節 小括および考察

本章では、Ussing chamber を用いて、家兎摘出角膜、結膜および結膜／強膜 composite における親水性化合物の permeability に対する PLA の効果を試験した。また、in vitro における PLA の安全性を結膜 integrity および viability に対する PLA の影響を経時的 TEER モニタリングおよび MTT 試験で評価した。

結膜を介した FD-4 の Papp は、 $7.39 \pm 1.23 (\times 10^{-8} \text{ cm/sec})$ であり、Horibe ら²⁶⁾が行った以前の研究から得られた値と同等であった。また、FD-4 の角膜での Papp ($0.25 \times 10^{-8} \text{ cm/sec}$)は、結膜の値よりも 10 倍低

かったが、timolol および polyethylene glycol を用いた以前の研究でも同様の知見が得られており^{27, 28)}、この差は妥当であると考えられる。一方、ビタミン B6 誘導体である pyridoxamine は、Caco-2 で carrier-mediated system を介して取り込まれることが報告されているが²⁹⁾、結膜および角膜では明らかになっていない。しかし、Caco-2 で得られた K_m ($11.99 \pm 1.41 \mu\text{M}$) および V_{max} ($67.63 \pm 3.87 \text{ pmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 3 \text{ min}^{-1}$) を考えると、結膜および角膜にこの系が発現していたとしても、本研究で用いた濃度 (2.5 mg/ml (10 mM)) では、十分に無視することができると考えられる。

0.1 mg/ml PLA(50)は、角膜、結膜および結膜／強膜を介した FD-4 および pyridoxamine の透過をコントロールより 4.7 倍から 9.8 倍増加させた (Tables 1 and 2)。これら PLA の促進効果は、過去に促進剤候補として検討された界面活性剤、EDTA および胆汁酸塩に匹敵するものであり⁷⁾、薬物の眼内吸収を十分に期待できるものと考えられた。結膜における PLA の透過促進効果は、これまで Caco-2、MDCK cell および家兎摘出鼻粘膜を用いた研究で示された結果と同様に、TEER の減少、すなわち組織 integrity の低下によるものであることが明らかとなった (Fig. 5)。しかし、PLA の適用後に新鮮な BRS で wash out すると、ベースラインの 15%程度まで低下した TEER は、ベースライン程度に回復したことから (Fig. 7)、結膜で観測された integrity の変化は一過的であると考えられた。Ohtake らは、種々分子量および濃度の PLA による in vivo での FD-4 の鼻粘膜吸収の増加が、一過적および可逆的であることを報告している²¹⁾。この所見は、in vivo 条件下での PLA の酵素分解および粘液線毛クリアランスが、可逆的な効果と上皮機能の維持に関与していることを示している。本研究での in vitro 試験は、この in vivo 鼻粘膜吸収試験とはいくつか異なるが、促進効果とそれに対応した結膜 integrity の変化は、PLA の存在時のみに一過的に引き起こされるものと思われる。また、涙液のターンオーバーが 2~3 分であることや、点眼後の薬物が 15~30 秒で急速に排出 (80%またはそ

れ以上) されることを考えると²⁵⁾、PLA による一過的な効果は、薬物の in vivo 眼内吸収でも認められるものと思われる。

これまで試験された界面活性剤、EDTA および胆汁酸塩のような眼内吸収促進剤は、角膜の形態学的変化や直腸細胞からの細胞質内酵素の漏出および赤血球の破壊といったような障害性が問題となり、現実的な使用は困難であった。しかし、MTT 試験において、5 mg/ml PLA (50)の 120 分間の適用は結膜の viability に影響を与えなかった (Fig. 8a)。加えて、PLA は、in vitro 試験において鼻粘膜上皮から細胞内成分の漏出を引き起こさないことや、in vivo 試験で鼻粘膜上皮の形態学的な変化を示さないこと、さらに溶血を引き起こさないことが報告されており^{13, 21)}、PLA の組織障害性はほとんどないと考えられる。これに対し、組織障害を引き起こすことが報告されている STDHF は¹³⁾、formazan 生成量を有意に減少させた (Fig. 8a)。また、5 mg/ml の STDHF は角膜でも有意な低下を引き起こしたが (Fig. 8b)、結膜に比べその割合は小さかった。この角膜と結膜間の差は、培養角膜および結膜を用いた以前の研究で報告されているように³⁰⁾、細胞毒性に対する感受性の違いによるものであると考えられる。Ohtake らにより、鼻粘膜を介した FD-4 の透過に対する 5 mg/ml STDHF の促進効果は、同濃度の PLA と同等であることが報告されていることから (STDHF: 4.9 倍, PLA; 4.8 倍)¹⁶⁾、本実験では同濃度の STDHF をポジティブコントロールとして用いた。STDHF は、ラットでの FD-4 の鼻粘膜吸収を増大させるが、細胞および組織障害を引き起こすので¹³⁾、PLA の作用点は STDHF のような胆汁酸塩と根本的に異なると考えられる。

Westergren ら³¹⁾は、5 mg PLA (MW 10 kDa) の経静脈投与は、血液脳関門の permeability の増大によりアルブミンの脳内への分布を増加させるが、PLA と同じ塩基性アミノ酸ポリマーである poly-L-lysine (PLL) (MW 10 kDa) よりも 15 倍高いことを報告しており、このことから、PLA は PLL に比べ膜透過性の増大に関してより高い効果を示すことが示唆される。一方、PLL は、293T 細胞を用いた MTT 試験に

において細胞の viability を減少させ、気管支上皮の障害により細胞内成分の漏出を引き起こすことが報告されている³²⁾。さらに、MTT 試験による予備的な検討から、5 mg/ml PLL (MW 34 kDa) の 120 分間適用後の結膜における formazan 生成量 ($1.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$) は、5 mg/ml PLA (50) ($5.2 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$) と比べ有意に低かった ($p < 0.05$)。したがって、塩基性アミノ酸ポリマーの中で、PLA は、能力および安全性の観点から、PLL よりも吸収促進剤としてより有用であると思われる。これらのことから、PLA は組織障害性を引き起こさないことが示唆されたが、反復または長期投与を含むさらなる検討が PLA の安全性の確立に必要である。

以上、PLA は、角膜、結膜および結膜／強膜 composite のような眼表面組織を介した FD-4 および pyridoxamine の透過性を顕著な組織障害を引き起こさずに増大させることが明らかとなった。

第 2 章 poly-L-arginine の透過促進効果と tight junction の開口との関連性

前章において、PLA による親水性化合物の透過促進効果と結膜 TEER の低下との間に相関関係が認められ、PLA は paracellular permeability を増大させる可能性が示唆された。Paracellular permeability は、occludin、claudin、zonula occluden (ZO) などのタンパク質から構成される tight junction (TJ) により制限されている^{33, 34)}。したがって、PLA はこれらタンパク質の会合状態を変化させることで親水性化合物に対する促進効果を示していると考えられる。Ohtake らは、PLA の鼻粘膜への適用が、occludin および ZO-1 の分布を細胞辺縁から細胞質内に変化させることを報告している¹⁹⁾。さらに、他のポリカチオン類の一つである protamine が、MDCK monolayers における occludin や claudin 1 のような TJ 関連タンパク質の分布を変化させることが示されている²⁰⁾。したがって、角膜や結膜のような眼

表面組織での TJ 関連タンパク質は、PLA のようなポリカチオン類の適用により分布が変化することが推測される。しかしながら、角膜および結膜は、これまでポリカチオン類の試験が行われている単層上皮ではなく重層上皮であり、PLA が重層上皮において単層上皮と同様の変化を引き起こすかは明らかとなっていない。また、結膜では電子顕微鏡を用いた研究から TJ 構造の存在が確認されているが、これまでに TJ 関連タンパク質の発現に関する報告はない。本章では、RT-PCR 法を用いて TJ 関連タンパク質である claudin-1、occludin、ZO-1、ZO-2 の mRNA レベルでの発現と免疫染色法による occludin および ZO-1 のタンパク質レベルでの発現を確認し、さらに、TJ 関連タンパク質の organization に対する PLA の効果を試験した。

第1節 家兔結膜における *tight junction* 関連タンパク質の発現

家兔摘出結膜から得られた total RNA を逆転写後、claudin-1、occludin、ZO-1、ZO-2 に対する特異的プライマーを用いて PCR を行い、産生物を 2%アガロースゲルにて電気泳動した結果を Fig. 9 に示す。ネガティブコントロールには逆転写を行わなかったサンプルを用いた (図中 RT(-))。用いたプライマーから予想される claudin-1、occludin、ZO-1、ZO-2 の PCR 産生物の分子量は、それぞれ、520 bp、187 bp、387 bp、408 bp であり、各 PCR 産物において予想される分子量に一致したバンドが認められたことから、家兔結膜における claudin-1、occludin、ZO-1、ZO-2 の mRNA レベルでの発現が明らかとなった。一方、ネガティブコントロールではバンドは検出されなかった。



Fig. 9 Expression of claudin-1, occludin, ZO-1 and ZO-2 mRNA in rabbit conjunctival epithelium.

Fig. 10 は、occludin および ZO-1 に対する特異的抗体を用いて免疫染色した結膜の蛍光顕微鏡像である。両タンパク質に由来するシグナルが細胞辺縁に認められ、家兎結膜での occludin および ZO-1 のタンパク質レベルでの発現が明らかとなった。さらに、Western blot により家兎結膜における claudin-1 および claudin-4 の発現が確認された (Fig. 11)。一般的に、claudin-1 や claudin-4 は tight な上皮に発現するといわれており³⁴⁾、さらに occludin と claudin-1 の共発現部位は強いバリア機能を示すことから³⁵⁾、結膜は比較的強いバリア機能を持つことが示唆される。

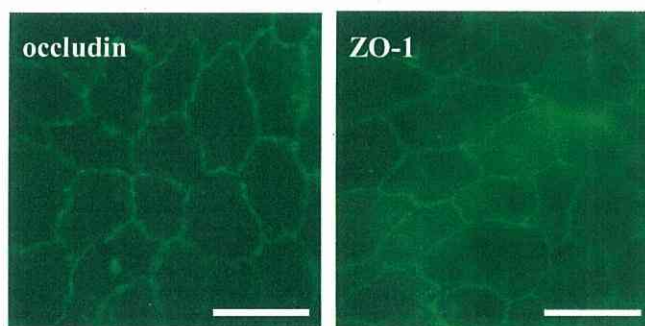


Fig. 10 Expression and localization of occludin and ZO-1 in rabbit conjunctival epithelium. Bar = 10 μ m

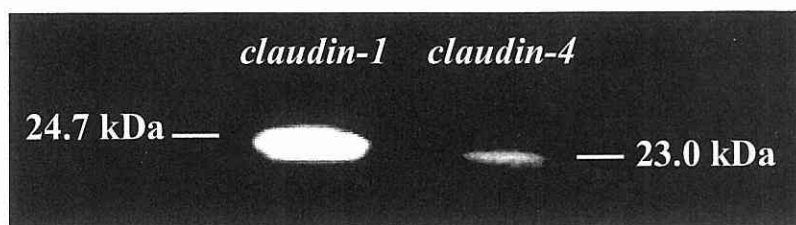


Fig. 11 Expression of claudin-1 and claudin-4 in rabbit conjunctival epithelium.

第2節 *tight junction* 関連タンパク質の *organization* に対する *poly-L-arginine* の効果

Fig. 12 は、家兎結膜における occludin および ZO-1 の蛍光顕微鏡画像である。前節の Fig. 10 に示したように、PLA の非添加時では occludin および ZO-1 は細胞辺縁に分布しているが、PLA の 60 分間の適用は、細胞辺縁における occludin のシグナルを完全に消失させ、また ZO-1 では大部分のシグナルが消失し、両タンパク質で細胞質領域全体に弱いシグナルが認められた (Fig. 12)。このことから、PLA の適用は、結膜の occludin および ZO-1 の分布を細胞辺縁から細胞質内へと変化させ、TJ の会合を崩すものと考えられる。一方、PLA の 60 分間適用後に、新鮮な BRS で PLA を wash out したときの蛍光顕微鏡像は、両タンパク質ともコントロールと同様に細胞辺縁にシグナルが認められた (Fig. 13)。すなわち、TEER の回復が認められた時間では、occludin および ZO-1 の分布が細胞辺縁に戻ることを意味し、TJ の会合状態が回復したものと考えられる。

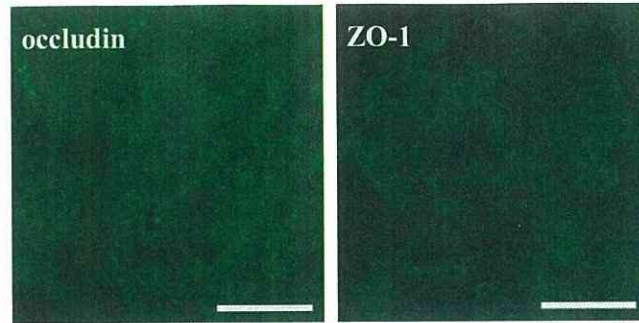


Figure 12 Distribution of occludin and ZO-1 60 min after application of 0.1 mg/mL PLA (50). Bar = 10 μ m

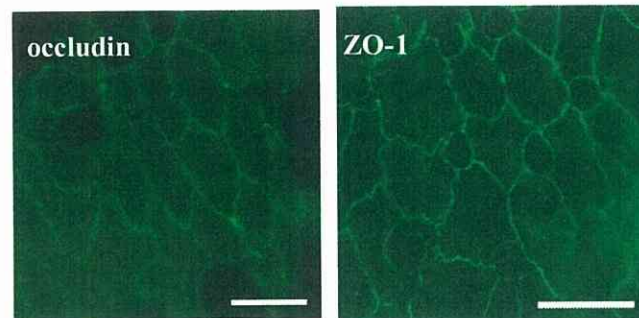


Figure 13 Distribution of occludin and ZO-1 120 min after washing out of 0.1 mg/mL PLA (50). Bar = 10 μ m

第3節 小括および考察

TJ は、上皮および内皮細胞の細胞-細胞接着部位に発現し、paracellular permeability に対するバリア機能、細胞の apical および basolateral 領域を分けるフェンス機能およびシグナリング機能の3つの役割を担っているといわれている³³⁾。

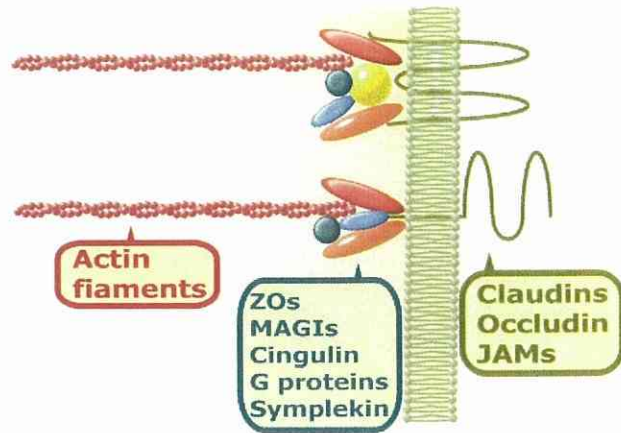


Fig. 14 The composition of tight junction.

TJ は Fig. 14 に示すように、膜貫通タンパク質の claudins, occludin, JAMs や裏打ちタンパク質の ZOs, MAGIs, G proteins および actin filament 等の多くのタンパク質から形成されるタンパク質複合体である。これまでに電子顕微鏡により結膜で TJ 構造が観測されていたが³⁶⁾ TJ を構成するタンパク質の情報はなかった。本研究の結果から、家兎結膜における claudin-1, occludin, ZO-1 および ZO-2 の mRNA レベルでの発現と occludin および ZO-1 のタンパク質レベルでの発現が明らかとなった (Figs. 9 and 10)。また、Western blot により claudin-1 および claudin-4 の発現が観測された (Fig. 11)。Huang らは、horseradish peroxidase (HRP) の耳静脈の投与後に結膜上皮の細胞間隙に浸透した HRP を観測し、HRP の浸透が結膜最外部の TJ によって妨げられることを示した³⁷⁾。同様に、表皮最外層の TJ が親水性の biotinylation reagent の paracellular permeation を制限し、この領域には claudin-1 および occludin が共局在していることにより強力なバリア機能を与えることが示唆されている³⁵⁾。表皮での occludin は重層上皮の最外部のみに発現していることを考えると、Huang らが報告した結膜最外部の paracellular permeation に対するバリアは、occludin と claudin-1 によるものと考えられる。

本研究の結果、結膜での occludin および ZO-1 の分布は、PLA の添

加により細胞辺縁から細胞全体へと変化した (Fig. 11)。同様の所見が、単層の鼻粘膜を用いた研究で明らかとなっている¹⁹⁾。さらに、PLA と同じポリカチオン類である protamine が MDCK monolayer の claudin-1 および occludin の分布を変化させることが報告されており²⁰⁾、PLA は単層上皮と同様の効果を重層上皮でも示すことが明らかとなった。PLA の適用から 60 分後で、TJ 関連タンパク質の分布の変化、すなわち TJ 会合の崩壊が生じたが、第 1 章 Fig. 7 にみられるように、この時点での結膜 TEER は添加前のおよそ 27% まで低下しており、両者間に密接な関係があるのは明白である。さらに、TEER の変化と親水性化合物の Papp の間に高い相関性が認められ (Fig. 5)、PLA による親水性化合物の透過性の増大は、TJ 関連タンパク質複合体の disassembly に基づく TJ の開口によるものであると考えられる。

PLA による TJ の organization の変化には、TJ 関連タンパク質のリン酸化／脱リン酸化の関与が示唆されている¹⁹⁾。しかし、本研究で認められた PLA の wash out 後の TJ の再構築に関してはこれまでに報告されていない。TJ の再構築には、新規に TJ 関連タンパク質が合成されることや細胞質内に移行した既存のタンパク質がそのまま再利用されることが可能性として考えられる。さらに、既存のタンパク質が利用される場合には、PLA の分解／排泄によりキナーゼやホスファターゼ等の活性状態が正常化することや TJ の開口によりホメオスタシスの機構が働き disassembly に対抗する細胞内シグナリングが活性化されることが考えられる。タンパク合成阻害剤の cycloheximide (50 μ M) を用いた予備的な検討から、TEER の回復、すなわち TJ の再構築に対して新規のタンパク合成は関与せず、既存のタンパク質が再利用されることが示唆された (Data not shown)。したがって、再構築には TJ 関連タンパク質のリン酸化／脱リン酸化状態の減弱や再構築のための別の細胞内シグナルの活性化等の細胞内イベントが生じているものと考えられ、今後詳細な検討が必要である。

PLA によって変化した TJ 関連タンパク質の分布は、新鮮な BRS による wash out でコントロールと同じ状態に戻ることから、PLA による TJ の organization に対する効果は可逆的であることが明らかとなった (Fig. 13)。また、この変化も wash out 後の TEER の変化 (Fig. 7) と対応したものであり、PLA は、可逆的に TJ を開口させることで促進効果を示すものと考えられる。

第 3 章 poly-L-arginine の家兎眼内への薬物吸収促進効果と安全性評価

点眼後の薬物は、Fig. 2 に示したように、種々眼内組織を介して前眼および後眼に吸収される。角膜、結膜、結膜／強膜といった眼表面組織は、薬物眼内吸収に対するバリアとなっており、第 1 章ではこれら組織を介した親水性化合物の透過に対する PLA の効果について in vitro 実験を行い、4.7～9.8 倍の透過促進効果が得られることを示した。そこで本章では、PLA を用いた眼内薬物送達の可能性を評価するために、親水性化合物の眼内吸収に対する PLA の吸収促進効果について in vivo 実験を行った。

第 1 節 poly-L-arginine による薬物の眼内吸収促進効果

本研究では、PLA の眼内吸収促進効果を評価するために、単回または反復点眼試験を行った。用いた PLA の濃度は、前章の MTT 試験で細胞毒性作用が認められなかった 5 mg/ml とした。Fig. 15 は、単回点眼 10、30 および 60 分後の各化合物の房水中濃度を示している。化合物のみ点眼した左眼をコントロール (○) とし、右眼は PLA を併用させた試験眼とした (Fig 中●)。各化合物において、コントロール群および PLA 併用群ともに点眼 30 分後に濃度のピークが認められた。PLA

併用群では、pyridoxamine および FD-4 の点眼 30 分後の房水中濃度は、コントロールに比べそれぞれ 29 および 16 倍高かった。さらに、0 分から 60 分までの濃度－時間曲線下面積 (AUC_{0-60}) を台形法にて算出すると、PLA の併用は pyridoxamine および FD-4 の AUC_{0-60} をそれぞれ 27.6 および 17.7 倍上昇させた (Table 3)。一方、単回試験では、両化合物とも硝子体中で検出されなかった。

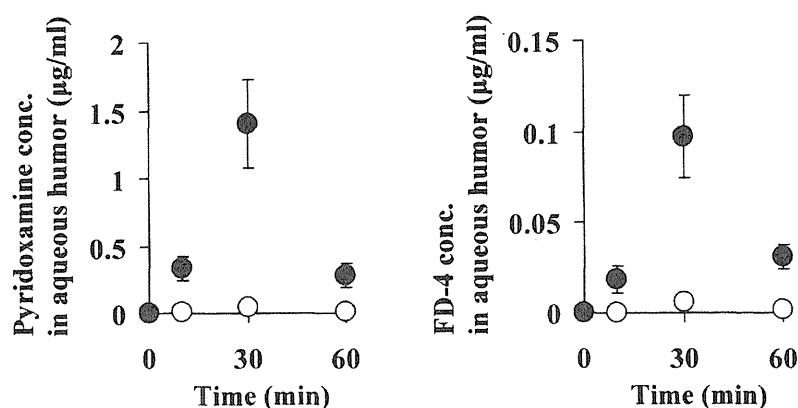


Fig. 15 Concentration-time profiles of pyridoxamine and FD-4 after a single instillation in the presence or absence of 5 mg/ml PLA (50). ○, in the absence of PLA; ●, in the presence of PLA.

Table 3. AUC_{0-60} of pyridoxamine and FD-4 estimated from a single instillation study.

	pyridoxamine	FD-4
Control (min·µg/ml)	1.61	0.18
PLA (min·µg/ml)	44.4 [27.6]	3.18 [17.7]

[]: enhancement ratio

そこで、PLA の硝子体への薬物吸収促進に対する可能性を確認するために、30 分おきに 5 回点眼を繰り返した反復点眼試験を行った (Table 4)。pyridoxamine および FD-4 の房水中濃度は PLA の併用によりそれぞれ 31.1 および 13.3 倍増大した。一方、PLA は pyridoxamine の硝子体中濃度を 5.35 倍増大させ、またコントロールで検出されなかった FD-4 の濃度を 14.1 ± 4.94 ng/ml まで増加させた。これらの結果より、PLA 含有薬物溶液の繰り返し投与によって、房水ばかりでなく後眼部薬物送達の指標として用いられる硝子体中濃度を増大できることが明らかとなった。

Table 4. Concentrations of pyridoxamine and FD-4 in aqueous humor and vitreous body measured by multiple instillation study

	pyridoxamine	FD-4
control (aqueous humor) ($\mu\text{g/ml}$)	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01
PLA (aqueous humor) ($\mu\text{g/ml}$)	2.88 ± 0.30 [31.1]	0.57 ± 0.05 [13.3]
control (vitreous body) (ng/ml)	0.96 ± 0.13	N.D.
PLA (vitreous body) (ng/ml)	5.16 ± 0.30 [5.35]	14.1 ± 4.94

[] ; enhancement ratio, N.D.; not detected,

Each data represents the mean \pm S.E. (n=4)

第2節 *in vivo* 家兎における poly-L-arginine の安全性の評価

本実験では、PLA を 5 日間反復点眼後の眼球をヘマトキシリン-エオジン染色し、障害性の指標として提唱されている角膜の stroma の肥厚を観察した^{38, 39)}。Table 5 は、種々化合物適用後の角膜 stroma の厚さを示し

ている。リンゲル液を適用したコントロール群と PLA 群で有意な差は認められなかったが、炎症性反応のポジティブコントロールとして用いられる lipopolysaccharide (LPS)^{40, 41)} の点眼群では、角膜の有意な肥厚が認められた。さらに、角膜での炎症性サイトカイン (TNF- α) を Western blot により検討すると、角膜肥厚を誘発した LPS 群で TNF- α の生成が認められたが、コントロールおよび PLA 群ではシグナルが検出されなかった (Fig. 16)。以上のことから、PLA は炎症性の変化を引き起こさないことが明らかとなった。

Table 5. Thickness of corneal stroma after multiple instillation of PLA and LPS.

	control	PLA	LPS
Thickness of corneal stroma (μm)	175 \pm 2.95	182 \pm 2.97	362 \pm 18.9*

* $p < 0.05$ vs. control. Each data point represents the mean \pm S.E. ($n = 4$).

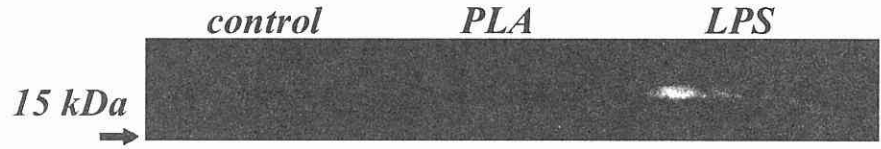


Fig. 16 TNF- α in cornea after multiple instillation of PLA and LPS.

第3節 小括および考察

本章では、in vivo における PLA の眼内薬物吸収促進効果を評価するために、第1章で用いた FD-4 および pyridoxamine の家兎点眼実験を行った。さらに、角膜 stroma の肥厚および炎症性サイトカインの TNF- α の発現を確認することで、PLA の安全性を評価した。

pyridoxamine および FD-4 の単回点眼後の房水中濃度は、点眼から 30 分後に最大濃度 (pyridoxamine; 0.045 $\mu\text{g/ml}$, FD-4; 0.006 $\mu\text{g/ml}$) に達した (Fig. 15)。これは、bunazosin⁴²⁾、flunarizine⁴³⁾、brimonidine⁴⁴⁾ および timolol⁴⁵⁾ において、単回点眼 30 分後に房水濃度のピークが認められたことと一致する。しかし、pyridoxamine では、点眼 10 分後にすでに房水中で 0.01 $\mu\text{g/ml}$ が検出されたのに対し、FD-4 では定量限界 (200 pg/ml) 以下であった。これには、分子サイズ (pyridoxamine; 168 Da, FD-4; 4 kDa) の違いによる膜中の拡散性の差が現れたものと考えられる。pyridoxamine の単回点眼後の房水中濃度は、FD-4 のそれよりもおよそ 1 オーダー高かったが、第 1 章の Tables 1 および 2 で示したように、種々摘出家兎眼表面組織における pyridoxamine と FD-4 の透過係数が 1 オーダー異なることを考えると、房水中濃度の差は眼表面組織の透過性が反映されているものと考えられる。

5 mg/ml (0.5%) PLA(50)の適用は、pyridoxamine および FD-4 の点眼 30 分後の房水中濃度をそれぞれ 29 倍および 16 倍増加させ、点眼 60 分後までの AUC_{0-60} を 27.6 および 17.7 倍増加させた (Table 3)。Podder らは、0.65% timolol 点眼 30 分後の房水中濃度が 0.025% benzalkonium chloride および 0.05% EDTA によりそれぞれ 1.8 倍および 1.6 倍増加することを示している⁴⁶⁾。また、0.025~1% の Azone は、1% cimetidine 点眼後の房水 AUC を 3.9~26 倍増大させ、同濃度の hexamethylene lauramide は 4.4~19 倍増加させることが報告されている⁴⁷⁾。さらに、PLA と同じポリカチオン類である chitosan (1%) および N-carboxymethylchitosan (1%) と 0.2% ofloxacin 混合液の点眼後の房水 AUC 値は、ofloxacin 製剤 (Exocin[®]) の AUC 値 (62.3 $\text{min}\cdot\mu\text{g/ml}$) に比べそれぞれ 2.6 倍および 2.4 倍高くなることが報告されている⁴⁸⁾。これらのことから、PLA は房水中薬物濃度の増大に対してこれまでに研究された吸収促進剤と同等またはそれ以上の吸収促進効果を示すことが明らかとなった。

30 分おきに 5 回点眼を繰り返した反復点眼試験において、PLA は pyridoxamine および FD-4 の房水中濃度を 31.1 倍および 13.3 倍増大させた。一方、後眼部への薬物送達に関して pyridoxamine の硝子体中濃度を 0.96 ng/ml から 5.16 ng/ml (5.35 倍) まで増加させ、さらにコントロールでは検出されなかった FD-4 を 14 ng/ml に増加させたことから (Table 4)、PLA は後眼部への薬物送達を可能にすることが明らかとなった。Williams らは、fatty acid の 0.5% capric acid と 28 kDa の抗 rat CD4 抗体断片(scFv)の混合液を家兎に 20 分毎に 12 時間反復点眼したとき、硝子体濃度が 50~150 ng/ml まで増大し、この scFv の活性が維持していることを示した⁴⁹⁾。このことは、現在加齢性黄斑変性症に対し治験 (phase III) が行われている抗 VEGF 抗体断片 (ranibizumab)⁵⁾といったタンパク質製剤の後眼部への薬物送達に対して、これら促進剤の併用が効果的であることを意味する。摘出角膜および結膜において、capric acid が atenolol、carteolol、tilisolol、timolol および befunolol のようなβ-ブロッカーの透過をそれぞれ 1.1~20.3 および 0.4~1.4 倍増大させたことを考慮すると⁵⁰⁾、第 1 章で得られた in vitro での促進効果をもとに PLA においても同様の吸収促進効果が期待される。これまで、吸収促進剤を用いた in vivo 点眼試験で房水および硝子体中濃度が増大することを示す報告はほとんどなく、本研究結果は、今後の点眼剤開発に重要な情報を与えるものと思われる。

眼組織に対する安全性の評価のために、眼刺激性の評価法として提案されている薬物適用後の角膜、とくに stroma の肥厚を試験した^{38, 39)}。また、stroma の肥厚は、炎症性変化の指標としても用いられている^{51, 52)}。Maurer らは、種々界面活性剤を用いて眼刺激性を評価し、界面活性剤が角膜上皮の障害や角膜の肥厚を引き起こすことを報告している⁵³⁾。本実験において PLA の 5 日にわたる反復点眼は、リングル液を適用したコントロール群と比較して stroma の厚さはほぼ同じであった (Table 5)。加えて、コントロール群および PLA 群では TNF- α の発現は認められなかった。これらの結果より、PLA は炎症性および眼刺激性反応を

引き起こさないことが明らかである。

以上、PLA は、炎症性および刺激性反応を引き起こさずに、親水性化合物の房水および硝子体への薬物送達を可能にする吸収促進剤であることが明らかとなった。

結論

本研究の結果から、PLA は組織障害を引き起こさずに角膜および結膜／強膜経路のバリアとなっている tight junction を開口させることで薬物吸収を促進し、房水および硝子体へ薬物送達を可能にする吸収促進剤であることが明らかとなった。このような促進剤の利用は、汎用性の高い点眼剤の有用性を一層高め、今後増加することが予想される糖尿病性網膜症や加齢性黄斑変性症に対する製剤開発に、ひいては重篤な視力障害の発生の抑制に貢献できるものと考えられる。

謝辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座 教授 森本雍憲先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に多大なる御尽力を賜りました城西大学 薬学部 病院薬剤学講座助手 上田秀雄先生に心より感謝の意を表します。

本研究に際し、終始有益な御助言並びに御指導、御激励を賜りました城西大学 薬学部 医薬品情報学講座 教授 小林大介先生に心より感謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御助言並びに御激励を賜りました城西大学 薬学部 薬物治療学講座 助教授 夏目秀視先生に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり御支援、御協力を戴きました城西大学 薬学部 生体防御学講座 教授 日比野康英先生、同講座 講師 岡崎真理先生並びに同講座 助手 臼井達洋先生に心より感謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御助言並びに御激励を賜りました城西大学 薬学部 病院薬剤学講座 助教授 大井一弥先生に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に当たり御支援、御協力を戴きました城西大学 薬学部 高橋宏和修士、梁野哲平学士、斎藤善貴修士に感謝いたします。

最後に研究室関連諸氏の御協力並びに御理解の下に本研究を遂行できましたことを感謝いたします。

実験の部

第 1 章

(1) 動物

体重2.5-3.0 kgの雄性日本白色種家兎は、東京実験動物（東京，日本）より購入した。本研究における家兎を用いたすべての試験は、“ the Guiding Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication #85-23)” に従って行った。

(2) 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran (MW ca. 3.8 kDa, FD-4)、poly-L-arginine hydrochloride (MW ca. 14.0, 35.5 and 141.4 kDa, PLA (10), PLA (50) and PLA (100)) および 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)は、Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)より購入した。Pyridoxamineは、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)より購入した。Sodium taurodihydrofusidate (STDHF)は、Leo Pharmaceuticals (Ballerup, Denmark)より分与された。その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

(3) 組織の調製

家兎を炭酸ガス実験動物安楽死装置（KN-750-1, Natsume Co., Ltd, Tokyo, Japan）にて徐々に二酸化炭素濃度を増加させ安楽死させた。その後直ちに眼球全体を眼窩から摘出し、角膜、結膜および強膜にダメージを与えないように注意深くトリミングを行い、各組織を tissue adapter（有効透過面積 0.44 cm²）にマウントした。その後、Fig. 17 に示す Ussing Chamber にセットし、bicarbonated Ringer's solution(BRS)を満たし、37℃、95% O₂ / 5% CO₂でバブリングし pH を 7.4 に維持した。BRS の組成は、111.5 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 29.2 mM NaHCO₃, 0.75 mM NaH₂PO₄, 1.04 mM CaCl₂, 0.74 mM MgCl₂, and 5 mM D-glucose である。

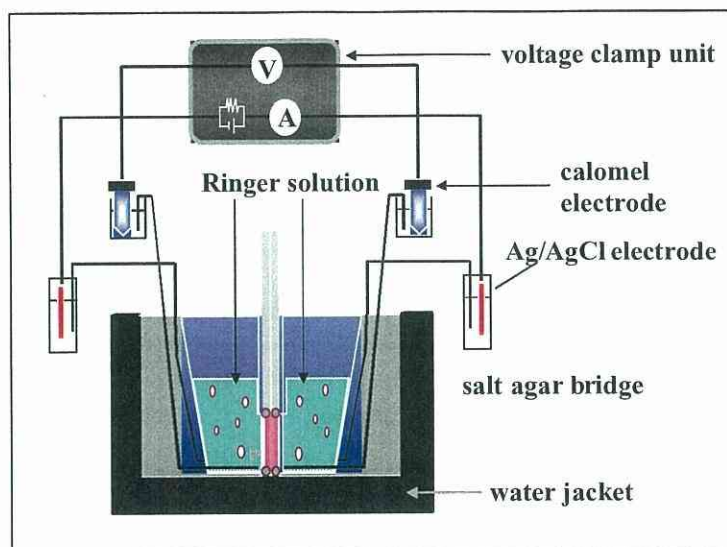


Fig. 17 System used in permeation study.

(4) 電気生理学的パラメータの測定

電気生理学的パラメータは、短絡電流測定装置（CEZ-9100, Nippon koden, Tokyo, Japan）を用いて測定し、自発的膜電位（PD）および短絡電流値（Isc）を各2対の塩橋（3.3M KCl 中に寒天を含む）とそれぞれカロメル電極および Ag/AgCl 電極に連結した系において測定した（Fig.17）。経上皮電気抵抗値（TEER）は、オームの法則に従い、次式より算出した。

$$TEER = (PD/Isc) \times A$$

ここで、Aは、有効透過面積（0.44 cm²）である。

(5) FD-4およびpyridoxamineの透過試験

電気生理学的パラメーター（PD, IscおよびTEER）が安定した後、ドナー側に各化合物を2.5 mg/ml適用し、20分毎にレシーバー側から0.5 mlサンプリングした。その後、直ちにフレッシュなBRS 0.5mlをレシーバー側に添加した。化合物の添加から120分後にPLAを添加し、120分間同様の試験を行った。

サンプルの定量は、fluorescence spectrophotometer (Shimadzu RF-10A_{XL})に接続したHPLC system（system controller: Shimadzu

SCL-10A_{VP}, auto injector: Shimadzu SIL-10A_{XL}, pump: Shimadzu LC-10A_{TV}, degasser: Shimadzu DGU-12A, column oven: Shimadzu CTO-10A) を用いて行った。FD-4およびpyridoxamine⁵⁴⁾の定量条件をTable 6および7に示す。

Table 6. HPLC condition for FD-4 in *in vitro* permeation study.

Mobile phase A: phosphate buffer (pH 8.0)
Mobile phase B: Acetonitrile
Elution condition: isocratic (A: B= 90: 10)
Flow rate: 1.0 mL/min
Column: TOSOH TSK-GEL octadecyl-NPR
Column temperature: 50 °C
Excitation wavelengths: 495 nm
Emission wavelengths: 515 nm

Table 7. HPLC condition for pyridoxamine in *in vitro* permeation

Mobile phase A: 3.5 mM 1-Octanesulfonic acid
1.2 mM Triethylamine
in 0.033 M Phosphoric acid (pH 2.16)
Mobile phase B: Acetonitrile
Elution condition: isocratic (A: B= 50: 50)
Flow rate: 1.2 mL/min
Column: KANTO KAGAKU Mightysil RP-18
Column temperature: 50 °C
Postcolumn mobile phase: 5.26 mM Sodium bisulfite
in 770 mM K₂HPO₄
Flow rate of postcolumn reagent: 0.3 mL/min
Excitation wavelengths: 328 nm
Emission wavelengths: 393 nm

(6) MTT 試験

角膜および結膜を Ussing chamber に上述のようにセットし、電気生理学的パラメータが安定した後、PLA または STDHF をドナー側に添加した。添加から 120 分後、ドナー側をフレッシュな 50 ml の BRS で wash out し、直ちにレシーバー側に MTT 試薬 0.3 mg/ml を適用した。3 時間後、レシーバー側をフレッシュな BRS 50 ml で wash out し、角膜および結膜を生検パンチでくり抜いた。その後、生成された formazan を 0.04 N HCl-isopropanol 溶液で一晩抽出し、uv-vis spectrophotometer (UV-1600, SHIMADZU, Kyoto, Japan)を用いて 570 nm における吸光度から formazan の定量を行った。

(7) データ解析

各親水性化合物の透過 flux は、累積一時間透過量曲線の定常状態に達したポイントから見積もった。みかけの透過係数 (Papp) は、flux を有効透過面積 (0.44 cm²) および初濃度 (2.5 mg/ml) に対して標準化することにより算出した。

すべてのデータは、平均値±S.E.で示した。グループ間の統計学的有意差は、Student's *t*-test により決定した。 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第 2 章

(1) 試薬

RNA^{later} RNA Stabilization Reagent、RNeasy Mini Kit および Qiagen OneStep RT-PCR Kit は、Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA)から購入した。TaKaRa One Step RNA PCR Kit は、TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan)から購入した。Mouse anti-occludin antibody、Mouse anti-ZO-1 antibody および Goat FITC-anti-mouse IgG antibody は、Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA)から購入した。Goat serum は、Cedarlane Lab. Ltd (Ontario, Canada)から購入した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を用いた。

(2) RT-PCR

前章と同様の方法で結膜を調製し、RNA/*later* RNA Stabilization Reagent でRNA を安定化させた後、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。Tight junction 関連 mRNA (claudin-1, occludin, ZO-1 and ZO-2) に対する RT-PCR は、Qiagen OneStep RT-PCR Kit または TaKaRa One Step RNA PCR Kit を用いて行った。使用した各 mRNA に特異的な primer を Table 8 に示す。増幅は、T GRADIENT (Biometra, Göttingen, Germany) を用いて行った。各タンパク質に対する条件を Table 9 に示す。PCR 産生物は、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、ethdium bromide で染色した後、紫外線下で観測した。

Table 8. Nucleotide sequences employed for PCR amplification.

Types	Sequence	Product size (bp)
claudin-1	5'-TCAGCACTGCCCTGCCCCAGT-3' 5'-TGGTGTGTTGGGTAAGAGGTTGT-3'	520
occludin	5'-CAGGGAATATCCACCTATCACTTC-3' 5'-ATCAGCAGCAGCCATGTACTC-3'	187
ZO-1	5'-CGGATGGTGCTACAAGTGATG-3' 5'-GCGAAAGGTAAGGGACTGGA-3'	387
ZO-2	5'-AGCAGACCCTCATCAACATCC-3' 5'-CCACGCTGTCTCCCTTCTTG-3'	408

Table 9. T GRADIENT condition for PCR amplification.

Types	RT (Time)	Denature temp. (Time)	Annealing temp. (Time)	Extension temp. (Time)	Cycles
claudin-1			63 °C (1 min)		
occludin	50 °C (30 min)	94 °C (1 min)	60 °C (1min)	72 °C (1 min)	40
ZO-1			60 °C (1min)		
ZO-2			66 °C (1min)		

(3) 免疫染色法

前章と同様の方法で結膜を調製し、電気生理学的パラメータが安定した後、ドナー側に 0.1 mg/ml PLA を適用した。60 分後、ドナー側をフレッシュな BRS で wash out し、結膜を OCT compound で包埋し、イソペンタンドライアイスで凍結させた。その後、Leica CM3050S cryostat を用いて凍結切片を作成した。標本をエタノールで 4℃、30 分間およびアセトンで室温、1 分間固定した後、TBS-Ca で洗浄した。その後、0.1% triton X-100 を 10 分間処理し、10% goat serum で 1 時間ブロッキングを行い、各 1 次抗体と共に 4℃で一晩インキュベートし、その後 2 次抗体を 2 時間室温で処理した。標本は、蛍光顕微鏡 BX51WI (Olympus Co., Tokyo, Japan)を用いて観察した。

第 3 章

(1) 試薬

マイヤーヘマトキシリンおよびエオジンは Sakura Finetek Japan Co., Ltd. より購入した。Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* 10, leupeptin, Na_3VO_4 , PMSF, pepstatin A, approtinin, benzamidine は sigma から購入した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を用いた。

(2) 単回点眼試験

家兎の左眼をコントロールとして 2.5 mg/ml の pyridoxamine または FD-4 50 μl を点眼し、右眼には 5 mg/ml PLA と 2.5 mg/ml pyridoxamine または FD-4 の混液 50 μl を点眼した。点眼から 10, 30, 60 分後に家兎を屠殺し、房水および硝子体を採取した。房水中の化合物の濃度は、フィルトレーション後に HPLC にて測定した。また、硝子体中濃度は、硝子体を 4℃, 12000 g で 10 分間遠心分離し、上清 500 μl に同量のアセトニトリルを添加混合した後、4℃, 12,000 g で 10 分間遠心分離し、上清をフィルトレーション後に HPLC にて測定した。FD-4 の HPLC 条件は前章と同様である。In vivo 試験での pyridoxamine の測定条件を Table 10 に示す。

Table 10. HPLC condition for pyridoxamine in *in vivo* instillation study.

Mobile phase A: 3.5 mM 1-Octanesulfonic acid
1.2 mM Triethylamine
in 0.033 M Phosphoric acid (pH 2.16)
Mobile phase B: Acetonitrile
Elution condition: gradient
0→14 min; A: B= 15: 85 → A: B= 30: 70
Flow rate: 1.2 mL/min
Column: KANTO KAGAKU Mightysil RP-18
Column temperature: 50 °C
Postcolumn mobile phase: 5.26 mM Sodium bisulfite
in 770 mM K₂HPO₄
Flow rate of postcolumn reagent: 0.3 mL/min
Excitation wavelengths: 328 nm
Emission wavelengths: 393 nm

(3) 反復点眼試験

単回投与と同様に左眼をコントロール眼、右眼を試験眼とした。投与間隔は 30 分とし、最初の点眼から 150 分後に家兔を屠殺し、前節と同様の方法で各化合物を測定した。

(4) 凍結切片の調製およびヘマトキシリン-エオジン染色

家兔の左眼をコントロールとして BRS を点眼し、右眼を試験眼として 5 mg/ml PLA または STDHF を点眼した。点眼回数は 3 回/日で、投与間隔は 6 時間、投与期間は 5 日間とした。投与終了後、眼球を摘出し、2.5% glutaraldehyde/TBS-Ca 溶液で 1 分間固定した後、前章と同様に凍結切片 (5 μm) を作成した。その後、切片をメタノールで固定し、マイヤーヘマトキシリン 1 分 30 秒、エオジン 2 分でヘマトキシリン-エオジン染色を行い標本とした。標本は前章と同様に顕微鏡にて観察した。角膜 stroma の厚さは、Lumina Vision (Mitani Co., Fukui, Japan) を用いて測定した。

(5) Western blot

第3章の方法(4)と同様に点眼を行った。また、ポジティブコントロールとして、Khatri らの方法に従い⁴⁰⁾、角膜を abrasion した後 200 μ g の lipopolysaccharide を適用し角膜炎モデルを作成した。種々処理後の角膜を摘出し、氷冷下 lysis buffer (1% SDS, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$ containing peptidase inhibitor (2 μ g/ml leupeptin, 2 mM Na_3VO_4 , 4 mM PMSF, 1 mM pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin, 5 mM benzamidine)) 中でホモジナイズし、4 $^{\circ}C$, 12000 g で 10 分間遠心分離した。上清中の総タンパク量は、BCA protein assay reagent kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) を用いて測定した。各サンプルは使用するまで -80 $^{\circ}C$ で保存した。各サンプルのタンパク質量を同濃度になるように lysis buffer で補正した後、2 x sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 10% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.004% Bromophenol blue) と混合 (1: 1) し、沸騰した温浴中で 5 分間煮沸した。これをサンプルとし SDS-PAGE を行った (15 mA/gel, 90 min)。その後 PVDF 膜に転写し (70 V, 120 min)、5% skim milk/0.1% Tween 20-PBS で 60 分間、室温にてブロッキングを行い、0.1% Tween 20-PBS で 5 分間洗浄後、Goat anti-rabbit TNF- α antibody (1: 500)を 4 $^{\circ}C$ で一晩処理した。0.1% Tween 20-PBS で 5 分間 5 回洗浄した後、horseradish peroxidase conjugated Donkey anti-goat IgG antibody (1: 5000)を室温で 120 分間処理し、Tween 20-PBS で 5 分 4 回、PBS で 5 分洗浄後、Super Signal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) を用いて発光させ、Image Reader LAS-1000 system (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて測定した。

参考文献

1. Frank R. N., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 48-58 (2004).
2. Fine S. L., Berger J. W., Maguire M. G., Ho A.C., *N. Engl. J. Med.*, **342**, 483-492 (2000).
3. Gragoudas E.S., Adamis A. P., Cunningham E. T. Jr., Feinsod M., Guyer D. R., *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2805-2816 (2004).
4. Cunningham E.T. Jr., Adamis A. P., Altaweel M., Aiello L. P., Bressler N. M., D'Amico D. J., Goldbaum M., Guyer D. R., Katz B., Patel M., Schwartz S. D., *Ophthalmology.*, **112**, 1747-1757 (2005).
5. Melnikova I., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 711-712 (2005).
6. Jager R. D., Aiello L. P., Patel S. C., Cunningham E. T. Jr., *Retina*, **24**, 676-698 (2004).
7. Sasaki H., Yamamura K., Tei C., Nishida K., Nakamura J., *J. Drug Target*, **3**, 129-135 (1995).
8. Rojanasakul Y., Liaw J., Robinson J. R., *Int. J. Pharm.*, **66**, 131-142 (1990).
9. Nishihata T., Tomida H., Frederick G., Rytting J. H., Higuchi T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 159-163 (1985).
10. Sasaki H., Yamamura K., Mukai T., Nishida K., Nakamura J., Nakashima M., Ichikawa M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **16**, 85-146 (1999).
11. Illum L., Farraj N. F., Davis S. S., *Pharm. Res.*, **11**, 1186-1189 (1994).
12. Miyamoto M., Natsume H., Satoh I., Ohtake K., Yamaguchi M., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Int. J. Pharm.*, **226**, 127-138 (2001).
13. Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Miyamoto M., Yamaguchi M., Hosoya K., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Int. J. Pharm.*, **185**, 1-12 (1999).
14. 夏目 秀視, 堀 聖一, 築根 忠司, 岩田 聡子, 宮本 操, 杉林 堅次, 森本 雍憲. *Drug Delivery System*, **14**, 21-25 (1999).
15. McEwan G T., Jepson M. A., Hirst B. H., Simmons N. L., *Biochem. Biophys. Acta*, **1148**, 51-60 (1993).
16. Ohtake K., Maeno T., Ueda H., Natsume H., and Morimoto Y., *Pharm. Res.*, **20**, 153-160 (2003).
17. Schipper N. G., Olsson S., Hoogstraate J. A., deBoer A. G., Varum K. M., and Artursson P., *Pharm. Res.*, **14**, 923-929 (1997).
18. Kotze A. F., Luessen H. L., de Leeuw B. J., de Boer B. G., Verhoef J. C., and Junginger H.

- E., *Pharm. Res.*, **14**, 1197-1202 (1997).
19. Ohtake K., Maeno T., Ueda H., Ogihara M., Natsume H., and Morimoto Y., *Pharm. Res.*, **20**, 1838-1845 (2003).
 20. Peixoto E. B., and Collares-Buzato C. B., *Cell Struct. Funct.*, **29**, 165-178 (2005).
 21. Ohtake K., Natsume H., Ueda H., and Morimoto Y., *J. Control Release*, **82**, 263-275 (2002).
 22. "Ophthalmic Drug Delivery System," Marcel Dekker, Inc., New York, 2003.
 23. Sasaki H., Ichikawa M., Kawakami S., Yamamura K., Nishida K., and Nakamura J., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 940-943 (1996).
 24. Ahmed I. and Patton T.F., *Int. J. Pharm.*, **38**, 9-21 (1987).
 25. Maurice D. M., *Invest. Ophthalmol.*, **6**, 464-477 (1967).
 26. Horibe Y., Hosoya K., Kim K. J., Ogiso T., and Lee V. H., *Pharm. Res.*, **14**, 1246-1251 (1997).
 27. Hamalainen K. M., Kananen K., Auriola S., Kontturi K., and Urtti A., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 627-634 (1997).
 28. Sasaki H., Igarashi Y., Nagano T., Yamamura K., Nishida K., and Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 17-21 (1995).
 29. Said H. M., Ortiz A., and Ma T. Y., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C1219-C1225 (2003).
 30. Papa V., Leonardi A., Getuli C., Pacelli V., Russo P., and Milazzo G., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **19**, 535-545 (2003).
 31. Westergren I., and Johansson B. B., *Acta Physiol. Scand.*, **149**, 99-104 (1993).
 32. Lee M., Nah J. W., Kwon Y., Koh J. J., Ko K. S., and Kim S. W., *Pharm. Res.*, **18**, 427-431 (2001).
 33. Tsukita S., Furuse M., and Itoh M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 285-293 (2001).
 34. Gonzalez-Mariscal L., Betanzos A., Nava P., and Jaramillo B. E., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **81**, 1-44 (2003).
 35. Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **156**, 1099-1111 (2002).
 36. Weyrauch K. D., *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, **97**, 573-588 (1983).
 37. Huang A. J., Tseng S. C., Kenyon K. R., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **30**, 684-689 (1989).
 38. Curren R. D., Harbell J. W., *Altern. Lab. Anim.*, **30 Suppl**, 69-74 (2002).

39. Wilhelmus K. R., *Surv. Ophthalmol.*, **45** 493-515 (2001).
40. Khatri S., Lass J. H., Heinzel F. P., Petroll W. M., Gomez J., Diaconu E., Kalsow C. M., Pearlman E., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2278-2284 (2002).
41. Holzer M. P., Solomon K. D., Vroman D. T., Vargas L. G., Sandoval H. P., Kasper T. J., Apple D. J., *J. Cataract Refract. Surg.*, **29**, 542-549 (2003).
42. Sakanaka K., Kawazu K., Tomonari M., Kitahara T., Nakashima M., Kawakami S., Nishida K., Nakamura J., Sasaki H., *Pharm. Res.*, **21**, 770-776 (2004).
43. Maltese A., Bucolo C., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **19**, 171-179 (2003).
44. Acheampong A. A., Shackleton M., John B., Burke J., Wheeler L., Tang-Liu D., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 421-429 (2002).
45. Yamamura K., Sasaki H., Nakashima M., Ichikawa M., Mukai T., Nishida K., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **16**, 1596-601 (1999).
46. Podder S. K., Moy K. C., Lee V. H., *Exp. Eye Res.*, **54**, 747-757 (1992).
47. Ismail I. M., Chen C. C., Richman J. B., Andersen J. S., Tang-Liu D. D., *Pharm. Res.*, **9**, 817-821 (1992).
48. Di Colo G., Zambito Y., Burgalassi S., Nardini I., Saettone M. F., *Int. J. Pharm.*, **273**, 37-44 (2004).
49. Williams K. A., Brereton H. M., Farrall A., Standfield S. D., Taylor S. D., Kirk L. A., Coster D. J., *Eye*, **19**, 910-913 (2005).
50. Sasaki H., Igarashi Y., Nagano T., Nishida K., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **12**, 1146-1150 (1995).
51. Karon M. D., Klyce S. D., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 2507-2511 (2003).
52. Ruberti J. W., Klyce S. D., Smolek M. K., Karon M. D., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 2523-2530 (2000).
53. Maurer J. K., Li H. F., Petroll W. M., Parker R. D., Cavanagh H. D., Jester J. V., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 291-300 (1997).
54. Bisp M. R., Bor M. V., Heinsvig E. M., Kall M. A., Nexø E., *Anal. Biochem.*, **305**, 82-89 (2002).

